Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Superintendência de Controle de Endemias

JÉSSICA LOPES DE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CULICÍDEOS COLETADOS NO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO, BRASIL, 2020

São Paulo
2021

JÉSSICA LOPES DE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CULICÍDEOS COLETADOS NO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO, BRASIL, 2020

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado a Superintendência de Controle de Endemias, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Antônio Guilherme de Souza", como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários.

Orientadora: Dra. Juliana Telles de Deus

Coorientadora: Dra. Lilian de Oliveira Guimarães

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Oliveira, Jéssica Lopes de

Investigação de flavivírus em culicídeos coletados no parque zoológico de São Paulo, Brasil, 2020 / Jéssica Lopes de Oliveira. – 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários.

Orientação: Prof(a). Dr(a). Juliana Telles de Deus.

Coorientador: Dra. Lilian de Oliveira Guimarães

1. Arbovírus/classificação. 2. Monitoramento epidemiológico. 3. Flavivirus/classificação. 4. Culicidae/patogenicidade.

SES/CCD/SUCEN - 104/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

Dedico este trabalho a todos que acreditam na veracidade da ciência e em sua potencialidade de mudar o planeta.

AGRADECIMENTOS

A Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e o Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP pelo fomento dos meus estudos;

A Superintendência de Controle de Endemias por todo aprendizado;

A minha família por todo o amor, carinho e apoio ao longo da minha vida;

Ao Daniel por todo apoio e carinho;

A coordenadora Dra. Karin pela oportunidade, por acreditar em minha capacidade, pela motivação, carinho e por transmitir seus conhecimentos;

A minha orientadora Dra. Juliana e coorientadora Dra. Lilian por todos os ensinamentos, dedicação, por indicar o caminho correto, e pela motivação durante o processo;

A todos os professores pela excelência e dedicação;

Aos alunos de mestrado e doutorado por toda atenção e ensinamentos;

Ao Dr Antônio Charlys da Costa e a Biom Vanessa dos Santos Morais pelo empréstimo de Sondas e Controles positivos para realização dos experimentos;

Aos meus amigos de classe pela parceria;

A todos que de alguma forma contribuíram para que o projeto fosse possível.

RESUMO

OLIVEIRA, Jéssica Lopes. **Investigação de flavivírus em culicídeos coletados no Parque Zoológico de São Paulo, Brasil, 2020**. 2020 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Sucen, São Paulo, 2021.

As arboviroses possuem grande importância na saúde pública devido ao seu forte potencial epidêmico, dentre os principais arbovírus que existem no Brasil estão os pertencentes à Família Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), tendo como principais vetores *Aedes* spp. e *Culex* spp. Esse estudo usou amostras coletadas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo que está situada em uma área de Mata Atlântica com 824.529 m², com rica diversidade de flora e fauna de vida livre em meio a área urbana do município de São Paulo (SP), é um local importante para ser investigado quanto a circulação viral devido a presença de pessoas, animais reservatórios, possíveis vetores de arboviroses e aves migratórias responsáveis por amplificar a dispersão dos arbovírus.

Foi estudado especificamente o gênero *Flavivírus*, agente etiológico da Febre do Nilo Ocidental, Zika vírus, Dengue e Febre Amarela, com o objetivo de detectar a sua circulação no Zoológico de São Paulo, local onde já foi detectada a circulação do vírus da febre amarela em primatas não humanos.

A captura dos culicídeos foi realizada no Zoológico tendo como local de coleta copa e solo utilizando-se armadilhas iscas luminosas (tipo CDC) para capturar alados. A circulação viral foi analisada dentro das seguintes etapas, coleta e identificação de culicídeos, extração de RNA viral, RT- qPCR para detecção de *flavivírus*, PCR do gene mitocondrial citocromo C oxidase (COI) para identificação molecular de amostras positivas utilizando-se DNA barcoding e Sequenciamento de pool positivo.

Foram coletados 250 exemplares de culicídeos de 7 gêneros diferentes, agrupados em 184 pools, a maior parte dos mosquitos coletados na área pertencem ao gênero *Culex* determinado como um mosquito de importância médica. Foi detectado positividade para flavivírus na espécie *Culex nigripalpus*.

Foi evidenciado a circulação de flavivírus na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Palavras-chave: Arbovírus/classificação. Monitoramento epidemiológico. Flavivírus/classificação. Culicidae/patogenicidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 9
1.1. CULICÍDEOS 9
1.2. CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA CULICIDAE 9
1.3. ARBOVIROSES 10
1.4. FLAVIVÍRUS 10
1.5. AS ARBOVIROSES E SEUS VETORES 11
1.6. FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO 12
2. OBJETIVOS 13
2.1. OBJETIVOS GERAIS 13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13
3. MATERIAL E MÉTODOS 14
3.1. COLETA DOS EXEMPLARES 14
3.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CULICIDAE E PREPARO DOS POOLS. 16
3.3. PESQUISA DE FLAVIVÍRUS 17
3.3.1. Purificação de RNA viral 17
3.3.2. RT-qPCR para detecção de Flavivírus 17
3.3.3. PCR do gene mitocondrial citocromo C oxidase (COI) no hospedeiro invertebrado 18
3.3.4. Sequenciamento 18
3.3.5. Aspectos éticos 19
4. RESULTADOS 19
4.1. EXEMPLARES COLETADOS 19
4.2. RT-qPCR PARA FLAVIVÍRUS 24
4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO 24
5. DISCUSSÃO 26

6. CONCLUSÕES 28
REFERÊNCIAS 29

1. INTRODUÇÃO

1.1. CULICÍDEOS

Vários insetos possuem valor econômico e ecológico como a produção de mel, a polinização, no entanto, diversas espécies são associadas como vetores de agentes patogênicos e incômodos humanos. Os mosquitos também conhecidos como pernilongos, mosquito-prego, muriçocas e carapanãs são insetos dípteros da família Culicidae, cuja algumas espécies são de interesse em saúde pública tendo como foco as fêmeas hematófagas, participam como vetores de arbovírus causando arboviroses como dengue e febre amarela, e vetores de outros parasitos como malária e filarioses (Santos, *et al*., 2015).

Os culicídeos são vetores de agentes patogênicos, por isso são de importância médica, podendo ter outros animais como hospedeiros amplificadores como por exemplo as aves, os primatas não humanos e o humano como hospedeiro acidental e terminal (Santos, *et al*., 2015).

Muitas espécies de *Culex* preferem se alimentar de aves, quando a abundância desse animal diminui, os *Culex* podem mudar para outras fontes de repasto, incluindo humanos (Kilpatrick *et al*., 2006; Takken e Verhulst, 2012; Simpson *et al*., 2012).

A identificação das espécies pode ser realizada pelos caracteres morfológicos e aliada a biologia molecular pode contribuir para uma melhor compreensão da sistemática filogenética, além disso, a análise da infectividade dos mosquitos aos patógenos é uma importante ferramenta para os programas de vigilância e controle de doenças (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994).

1.2. CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA CULICIDAE

Segundo o autor Harbach que mantém o site Mosquito Taxonomic Inventory atualizado, temos mais de 3.500 espécies de mosquitos catalogadas no mundo, sendo que cerca de 500 ocorrem no Brasil, a Família Culicidae está agrupada em subfamílias

Culicinae e Anophelinae, a subfamília Culicinae possuindo 110 gêneros e várias tribos, destacando-se com o maior número de representantes.

Foi estabelecido 3 tribos para a subfamília Culicinae: Anophelini, Culicini e Toxorhynchitini.

A taxonomia de mosquitos pode variar dependendo do autor e da época considerada, podendo classificar Toxorhynchitinae como uma subfamília.

1.3. ARBOVIROSES

A dispersão das arboviroses está relacionada ao comportamento humano, globalização, mudanças climáticas e a adaptação de insetos vetores às atividades antrópicas (LOPES, *et al*., 2014). O deslocamento geográfico do ser humano propicia e aumenta o risco de carregar patógenos de outras localidades, causando emergência ou reemergência de doenças (LIMA-CAMARA, 2016).

Dentre os principais arbovírus que ocorrem no Brasil estão os pertencentes à Família *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), Família *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e Família *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), sendo o gênero *Flavivirus* o principal agente causador de infecções no Brasil (CUNHA, 2018).

1.4. FLAVIVÍRUS

Os flavivírus possuem o ciclo de replicação intracelular, sendo assim, ele não possui metabolismo ativo fora da célula hospedeira, é constituído por uma molécula de ácido nucleico envolto por uma capa de proteína que pode conter lipídeos e açúcares, podendo defini-lo como um arranjo molecular, consiste em RNA de fita simples com de 11kb. O vírus adentra a célula com a finalidade de se replicar e amplificar, carregando as informações genéticas para dentro de outra célula que será infectada (Santos, *et al*., 2015).

São propensos a surgir em novas regiões geográficas representando o surgimento de arboviroses, os fatores que auxiliam nessa questão incluem-se o desmatamento e o aquecimento global pois, a urbanização deixa esses vetores mais próximos da população e o aumento da temperatura auxilia e acelera o desenvolvimento do vetor para a fase adulta (MACKENZIE, *et al*., 2009).

Os *flavivírus* são transmitidos por diversas espécies de mosquitos vetores, geralmente mosquitos do gênero *Aedes e Culex* (HUANG, *et al*., 2014).

1.5. AS ARBOVIROSES E SEUS VETORES

Dentre as arboviroses causadas por *flavivírus* temos o vírus da Febre do Nilo Ocidental (FNO) foi isolado pela primeira vez na África em 1937, a partir de então alguns surtos foram registrados na África, Europa, Ásia e Oriente Médio (LIMA-CAMARA, 2016).

Ao mesmo tempo que casos de encefalite humana ocorriam em Nova York foi observado pássaros atingidos por uma encefalite viral desconhecida, essa encefalite foi diagnosticada como Saint Louis, após análise molecular por sequenciamento viram que se tratava de Febre do Nilo Ocidental. O gênero *Culex* possui os principais vetores da arbovirose, incluindo o *Culex quinquefasciatus* (LIMA-CAMARA, 2016).

Zika vírus (ZIKAV) foi detectado inicialmente no macaco rhesus (*Macaca mulatta*) no continente africano (BRESSAN, *et al*., 2020). Tem como vetor o *Aedes aegypti*, a doença parecia repentina, no entanto, já estava presente em anos anteriores, no Brasil houve um aumento do número de microcefalia em recém-nascidos causada pela doença e um ano depois desse ocorrido foi confirmada a relação entre Zika vírus em gestantes e microcefalia em bebês, a vigilância epidemiológica do Sistema Único de Saúde (SUS) possibilitou uma rápida detecção do aumento do número de casos de microcefalia devido ao seu forte potencial epidêmico, sendo necessário medidas urgentes de prevenção, controle e contenção de danos e agravos a saúde pública (GARCIA, 2018). Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) de 2020, tivemos 13 casos autóctones de Zika vírus no estado de São Paulo.

O vírus dengue possui quatro sorotipos conhecidos como DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, a doença ocorre em países tropicais e subtropicais, tem como principal vetor o *Aedes aegypti* que vive em área urbana (JUNIOR, *et al*., 2017). Segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) de 2020, tivemos um total de 190.183 casos autóctones de dengue no estado de São Paulo.

A Febre Amarela tem como vetores fêmeas dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, os hospedeiros e amplificadores do agente etiológico são os primatas não

humanos destacando-se os bugios (*Alouatta)*, saguis (*Callithrix)* e macacos-prego (*Sapajus)*, o ser humano ao adentrar em áreas de mata e ser picado pelo mosquito infectado torna-se um hospedeiro acidental. No caso da febre amarela do ciclo urbano ocorre pelo vetor *Aedes aegypti* que é o responsável pela transmissão da doença (SAAD, *et al*., 2016).

Recentemente tivemos um surto de Febre Amarela que se iniciou no Centro Oeste do Estado de São Paulo em 2016 alcançando a grande São Paulo em 2017, esse surto durou até 2020. Segundo dados obtidos do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) de 2017 a 2019 tivemos um total de 595 casos autóctones humanos confirmados e 773 de epizootias confirmadas em São Paulo. Duas dessas notificações de epizootias positivas referem-se à primatas não humanos do zoológico de São Paulo, sendo o primeiro de vida livre encontrado em janeiro de 2018 e o segundo abrigado no zoológico notificado em janeiro de 2019 (CVE, 2020).

Por intermédio da urbanização os mosquitos estão cada vez mais próximos da população, quando se trata de ambientes de mata dentro de cidades tendo como exemplo zoológicos e parques, torna-se uma condição favorável ao surgimento e ressurgimento de arboviroses (HEYM, *et al*., 2019).

É extremamente importante o monitoramento em ambiente de zoológico visto que as doenças são detectadas em fase inicial pois, os animais são rigorosamente acompanhados, todavia é um lugar ideal para criadouros de mosquitos vetores de arboviroses que podem causar doenças tanto em animais quanto em humanos (HEYM, *et al*., 2019).

Desta forma, foi realizado um levantamento entomológico analisando a distribuição dos culicídeos e detecção molecular de arbovírus do gênero Flavivírus na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

1.6. FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo, foi inaugurada em março de 1958 em uma área de 824.529 m² de Mata Atlântica, constitui um território com nascentes do riacho do Ipiranga, rica diversidade de flora e fauna de vida livre em meio a área urbana do município de São Paulo - SP (BRESSAN, *et al*., 2020).

A Fundação mantém grande variedade de espécies de animais entre eles 441 mamíferos, 817 aves, 565 répteis, 251 anfíbios e 23 invertebrados. Além de realizar importante trabalho de conscientização ambiental, recebendo cerca de 200 mil visitantes a cada mês, a fundação desenvolve ações relacionadas à biodiversidade e conservação de fauna ameaçada de extinção, além de participar de diferentes áreas de pesquisas (BRESSAN, *et al*., 2020).

Considerando toda a riqueza de fauna e flora, o fato de ser uma área de grande circulação de pessoas, a presença de animais reservatórios e possíveis vetores de agentes patogênicos podem apresentar condições propícias para o desenvolvimento de arboviroses tornando a investigação da circulação de arbovírus na área como uma importante estratégia para obtenção de informações para a vigilância de zoonoses (DIDO, *et al*., 2011).

Através do levantamento entomológico e análise molecular para detecção de flavivírus podemos antever a transmissão de arboviroses e ter conhecimento das espécies de culicídeos com positividade para o agente etiológico a fim de manter a vigilância epidemiológica para impedir uma epidemia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Detectar a ocorrência de flavivírus no zoológico de São Paulo

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as espécies de culicídeos coletados no Zoológico de São Paulo.
Detectar flavivírus em culicídeos coletados no zoológico de São Paulo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DOS EXEMPLARES

Os mosquitos foram coletados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo em 16 armadilhas (AIL) com isca luminosa que ficaram expostas por 12 horas entre os crepúsculos vespertino e matutino, as coletas de exemplares adultos de culicídeos noturnos foram realizadas em dois locais de captura, sendo esses locais em copa de árvores e solo em ambiente de mata dentro do zoológico, as armadilhas foram distribuídas em pontos com maior quantidade de mata, observa-se abaixo na (Figura 01) a sua distribuição pelo parque.

Figura 01 - Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), onde localiza-se em seu centro a Fundação Parque Zoológico de São Paulo, os marcadores indicam os pontos de coleta de Culicídeos no Zoológico. Figura A: mapa do Parque Estadual das Fontes de Ipiranga (PEFI). Figura B: mapa da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

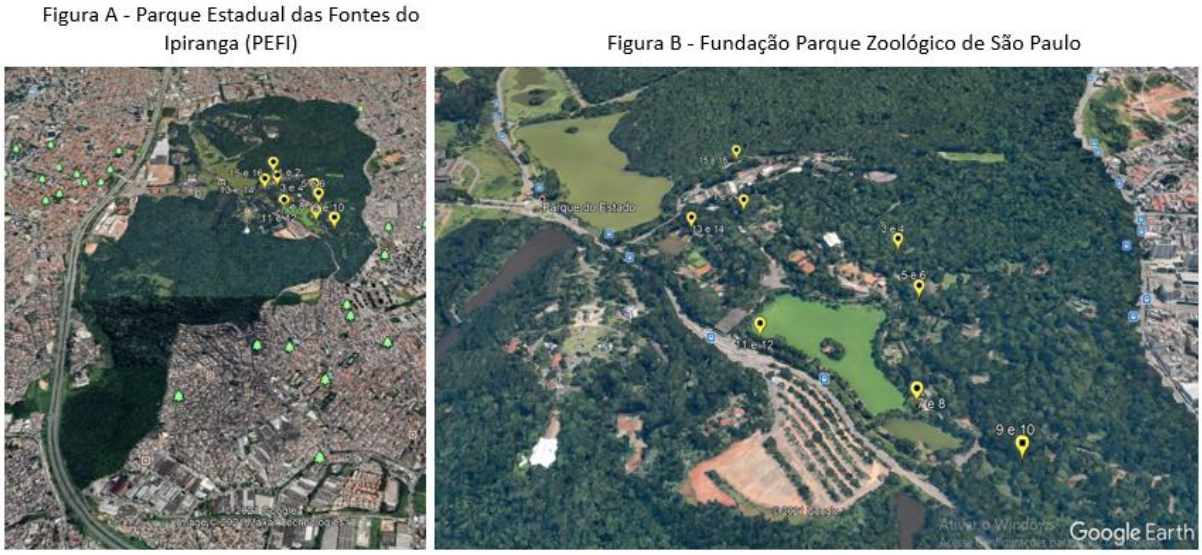


Imagem Google Earth Pro (2020).

Armadilha Isca Luminosa (AIL) CDC é automática, sua estrutura consiste em uma proteção contra chuva em forma de “chapéu”, uma base para sustentar o motor no qual se conecta a hélice e a lâmpada de pequeno porte seguido de um tecido conectado ao copo coletor, seu funcionamento é a base de bateria, possui uma pequena lâmpada e um recipiente acoplado para armazenamento de gelo seco para o aumento de efetividade da coleta em solo e copa (Figura 02).

Figura 02 – Armadilhas Isca Luminosa (AIL) para coleta de Culicídeos adultos. Figura A: armadilha instalada no solo. Figura B: armadilha instalada em copa de árvore. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, maio de 2020.

Figura A – AIL no solo

Figura B – AIL na copa

Os culicídeos foram capturados nas datas de 05 maio de 2020 a 07 de maio de 2020, congelados ainda vivos em nitrogênio líquido e acondicionados em criotubos devidamente identificados. Os dados de cada coleta foram registrados em boletim específico incluindo técnica empregada, variáveis climáticas, localização, data, quantidade de tubos e período de coleta, as amostras foram armazenadas em freezer -70°C.

Na (Tabela 01) estão as informações sobre altura de cada armadilha isca luminosa (AIL), seu local de captura e o ponto em que ficou localizada.

Tabela 01 - Dados de captura entomológica na Fundação Parque Zoológico de São Paulo em 2020.

Número da AIL	Local de captura	Altura AIL/plataforma	Ponto	Coordenadas
1	copa	7,5 metros	Bosque das aves	23°38'54.0"S 46°37'13.4"W
2	solo	-		
3	copa	7,5 metros	Recinto 113	23°38'58.3"S 46°37'03.9"W
4	solo	-		
5	copa	10 metros	Corredor 61	23°39'01.5"S °4637'03.0"W
6	solo	-		
7	copa	6,5 metros	Ponte do lago	23°39'08.1"S 46°37'03.9"W
8	solo	-		
9	copa	8 metros	Recinto 69	23°39'11.2"S 46°36'59.7"W
10	solo	-		
11	copa	6 metros	Lago 70	23°39'04.0"S 46°37'11.9"W
12	solo	-		
13	copa	6 metros	Recinto flamingos	23°38'55.2"S 46°37'16.8"W
14	solo	-		
15	copa	8 metros	Extra	23°38'48.2"S 46°37'14.4"W
16	solo	-		

3.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CULICIDAE E PREPARO DOS POOLS.

Os culicídeos adultos capturados foram agrupados em pools contendo de dois a cinco exemplares de acordo com a espécie, data, ponto e local de coleta. Em alguns mosquitos foi possível apenas a identificação em nível de gênero por se tratar de um exemplar com danificações morfológicas, e esses foram processados individualmente. Foram identificados em mesa fria com estereoscópio, utilizando-se as chaves taxonômicas propostas por Lane (1953), Consoli e Lourenço de Oliveira (1994) e. Forattini (2002).

3.3. PESQUISA DE FLAVIVÍRUS

3.3.1. Purificação de RNA viral

Os pools/amostras individuais de mosquitos inteiros foram triturados usando 0,5 g de esferas de cerâmica de 1,4mm (MagNA Lyser Green Beads - Roche Molecular Systems) em tampão PBS 1X livre de RNase, durante 90 seg a 1600 rpm e então centrifugadas por 5 min a 14000 rpm a 4 °C. A purificação do RNA viral foi então realizada utilizando-se o kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas a -70 °C até o processamento.

3.3.2. RT-qPCR para detecção de Flavivírus

Foi realizada uma RT-qPCR (transcrição reversa seguida por uma reação em cadeia da Polimerase em tempo real) usando um sistema de detecção com o uso de sonda de hidrólise no equipamento de PCR em Tempo Real Step One. Para este experimento foi usado o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega). A reação foi realizada em 20µl com 5µl de RNA, 1X de tampão para reação, 1X da mistura de Enzimas para RT-qPCR em uma única reação, 1µM de cada iniciador Flavi All S TACAACATGATGGGGAARAGAGARAA e Flavi All AS2 GTGTCCCAGCCNGCKGTGTCATCWGC (Patel, *et al*., 2013), 250nM da sonda de hidrólise Flavi all [FAM] TG[+G]TWYATGT[+G]GYTNG[+G]RGC [BHQ1] (Patel, *et al*., 2013), 400nM da Referência Passiva ROX e Água livre de DNase e RNase para atingir o volume de 20µl. A reação de Transcrição Reversa foi realizada por 10 min a 40 °C e 10 min a 45°C, seguida por um estágio de inativação da Transcriptase Reversa e Ativação da Taq DNA Polimerase a 95 °C por 10 min. A amplificação foi realizada em 45 ciclos de 95°C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Em cada reação de RT-qPCR foram usados 2 Controles Negativos (Tampão de Eluição de RNA do Kit de Purificação de RNA viral) e 2 Controles Positivos (Vírus da Dengue).

3.3.3. PCR do gene mitocondrial citocromo C oxidase (COI) no hospedeiro invertebrado

Nos exemplares em que não foi possível confirmar a espécie do mosquito morfologicamente, foi feita uma identificação molecular das amostras positivas utilizando *DNA barcoding* através de PCR com oligonucleotídeos universais para amplificação de um fragmento de 710 pb da subunidade I do gene mitocondrial citocromo C oxidase I (COI) em invertebrados. Os iniciadores usados foram descritos por Folmer *et al*., 1994 (LCO1490: 5'– GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTGG – 3' e HCO2198: 5' –TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA – 3') e as condições da PCR usadas foram descritas por Ruiz *et al*., 2010 com algumas modificações, onde a reação ocorreu em um volume de 25µl com 2 mM de $MgCl_2$, Tampão de PCR 1X, 0,5 mM de cada dNTP, 300 nM de cada iniciador, 0,2 U de Taq DNA Polimerase de alta fidelidade (Platinum™ *Taq* DNA Polymerase – Thermo Fisher Scientific) e 2 µL de DNA. O perfil de ciclagem iniciou-se com um ciclo de desnaturação empregando-se 95 °C por 5min, repetindo por 34 vezes: 95 °C por 30 seg (desnaturação), 48 °C por 30 seg (anelamento) e 72 °C por 45 seg (extensão); terminando com um ciclo de extensão final com 72 °C por 10min.

O produto da PCR foi visualizado em um gel de Agarose 1%, onde dez microlitros deste foram aplicados no gel usando um Tampão de Carregamento 1X, o fragmento de DNA foi revelado usando um intercalante de DNA GelRedTM (Uniscience) e seu tamanho foi dado em comparação ao padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific). O perfil de corrente elétrica empregado foi 90V por 60 min.

3.3.4. Sequenciamento

O produto da PCR para identificação molecular foi sequenciado diretamente em ABI Genetic Analyser (ABI, USA) usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Walthan, Massachutes, EUA) empregando os mesmos oligonucleotídeos usados nas respectivas PCRs. Para a reação foi usado 1µL de iniciador 5pmol, 3,25 µL do tampão de Reação, 0,75µL de BigDye, 1µL do produto da PCR e 4,5µL de água ultrapura. O perfil de amplificação empregado foi: 96

°C por 60 seg e 40 ciclos de 96°C por 15 seg, 50 °C por 4min. Para a precipitação do material foi adicionado 9µL de isopropanol 66% e mantido a temperatura ambiente por 15 min. O material foi centrifugado por 20 min a 12000 rpm e descartado o sobrenadante. Em seguida foi realizada uma lavagem com 150 µL de isopropanol 75% e centrifugação a 12000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o isopropanol foi removido e a amostra permaneceu à temperatura ambiente até completar a evaporação do álcool. A amostra então recebeu 10 µL de formamida, foi desnaturada e aplicada no sequenciador de capilar 3500 (Applied Biosystems) multiusuário do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

As sequências geradas foram corrigidas e alinhadas no software SeqMan (DNASTAR Lasergene versão 7.0.0) para criar sequência consenso. Foi usada a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al*., 1990) no banco de dados GenBank para identificar a espécie do mosquito usando o gene *coi*.

3.3.5. Aspectos éticos

As amostras usadas neste trabalho são destinadas ao projeto de pesquisa Hemosporídeos e arbovírus emergentes em culicídeos e culicoides do Parque Zoológico de São Paulo (Processo FAPESP: 2018/16232-1) que possui permissão para coleta dos mosquitos para finalidade científica (SISBIO: Número: 67527).

4. RESULTADOS

4.1. EXEMPLARES COLETADOS

Em três dias de coleta entomológica na Fundação Parque Zoológico de São Paulo foram coletados 250 espécimes de culicídeos pertencentes a 7 gêneros, onde foram identificadas 14 espécies diferentes (Tabela 02). Foram formados 184 pools separados por espécies, todos submetidos à detecção viral.

Tabela 02: Espécimes coletados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, número de pools formados e resultado da RT-qPCR.

Espécie de Mosquitos	Total Coletado	%	Pools/Amostras individuais processadas	Amostras Positivas
Aedes (Och.) scapularis	3	1.2	3	0
Aedes (Stg.) albopictus	1	0.4	1	0
Aedes sp.	1	0.4	1	0
Anopheles (Nys.) argyritarsis	1	0.4	1	0
Anopheles (Nys.) benarrochi	3	1.2	3	0
Anopheles sp.	2	0.8	2	0
Coquillettidia (Rhy.) hermanoi	1	0.4	1	0
Culex (Cux.) ameliae	8	3.2	3	0
Culex (Cux.) bidens	1	0.4	1	0
Culex (Cux.) chidesteri	22	8.8	17	0
Culex (Cux.) Complexo Coronator	7	2.8	7	0
Culex (Cux.) declarator	1	0.4	1	0
Culex (Cux.) habilitator	84	33.6	33	0
Culex (Cux.) scimitar	12	4.8	7	0
Culex (Cux.) sp.	82	32.8	82	1
Culex (Mel.) Seção Melanoconion	1	0.4	1	0
Culex (Mel.) sp.	15	6.0	15	0
Mansonia (Man.) indubitans	1	0.4	1	0
Mansonia (Man.) sp.	1	0.4	1	0
Mansonia (Man.) wilsoni	1	0.4	1	0
Wyeomyia (Prl) confusa	2	0.8	2	0
Total	250	100	184	1

Os mosquitos mais abundantes pertenciam ao gênero *Culex* (93%), desses 33,6% eram *Culex habilitator* e 32,8% eram *Culex (Cux)* sp.

Conforme (Tabela 03) e (Tabela 04) podemos observar as espécies processadas em Pools com sua quantidade de exemplares e amostras individuais, uma amostra de *Culex (Cux.)* sp. teve positividade para flavivírus na RT – qPCR.

Tabela 03 – Total de pools formados e amostras individualizadas analisadas, ambas com o resultado da RT - qPCR.

Espécie de Mosquitos	**Total de amostras individuais analisadas**	**Amostras individuais positivas**	**Total de mosquitos analisados em pool**	**Pools positivos**
Aedes (Och.) scapularis	3	0	0	0
Aedes (Stg.) albopictus	1	0	0	0
Aedes sp.	1	0	0	0
Anopheles (Nys.) argyritarsis	1	0	0	0
Anopheles (Nys.) benarrochi	3	0	0	0
Anopheles sp.	2	0	0	0
Coquillettidia (Rhy.) hermanoi	1	0	0	0
Culex (Cux.) ameliae	1	0	7	0
Culex (Cux.) bidens	1	0	0	0
Culex (Cux.) chidesteri	13	0	9	0
Culex (Cux.) Complexo Coronator	7	0	0	0
Culex (Cux.) declarator	1	0	0	0
Culex (Cux.) habilitator	13	0	71	0
Culex (Cux.) scimitar	4	0	8	0
Culex (Cux.) sp.	82	**1**	0	0
Culex (Mel.) Seção Melanoconion	1	0	0	0
Culex (Mel.) sp.	15	0	0	0
Mansonia (Man.) indubitans	1	0	0	0
Mansonia (Man.) sp.	1	0	0	0
Mansonia (Man.) wilsoni	1	0	0	0
Wyeomyia (Prl) confusa	2	0	0	0
Total	**155**	**1**	**95**	**0**

Tabela 04 – Espécies separadas em pools e sua quantidade de exemplares.

Espécie de mosquitos	Pool	Quantidade de exemplares
Culex (Cux.) ameliae	B10	5
	B28	2
Culex (Cux.) chidesteri	B7	2
	B8	3
	B176	2
	B185	2
Culex (Cux.) habilitator	B40	4
	B53	4
	B57	4
	B63	5
	B65	5
	B76	2
	B81	2
	B89	5
	B99	3
	B108	2
	B114	4
	B162	2
	B171	4
	B193	5
	B194	3
	B209	5
	B210	5
	B217	2
	B221	3
	B223	2
Culex (Cux.) scimitar	B74	3
	B79	3
	B100	2
Total	**29**	**95**

O Bosque das Aves e o Recinto 113 foram os pontos com maior número de exemplares coletados (51 cada). Com exceção dos pontos Extra e Recinto 69, as armadilhas instaladas na copa coletaram mais indivíduos que as armadilhas instaladas no solo (174 versus 76). Mosquitos do gênero *Culex* foram coletados em todas as armadilhas e de maneira geral, armadilhas instaladas no solo coletaram um maior número de gêneros (Tabela 03).

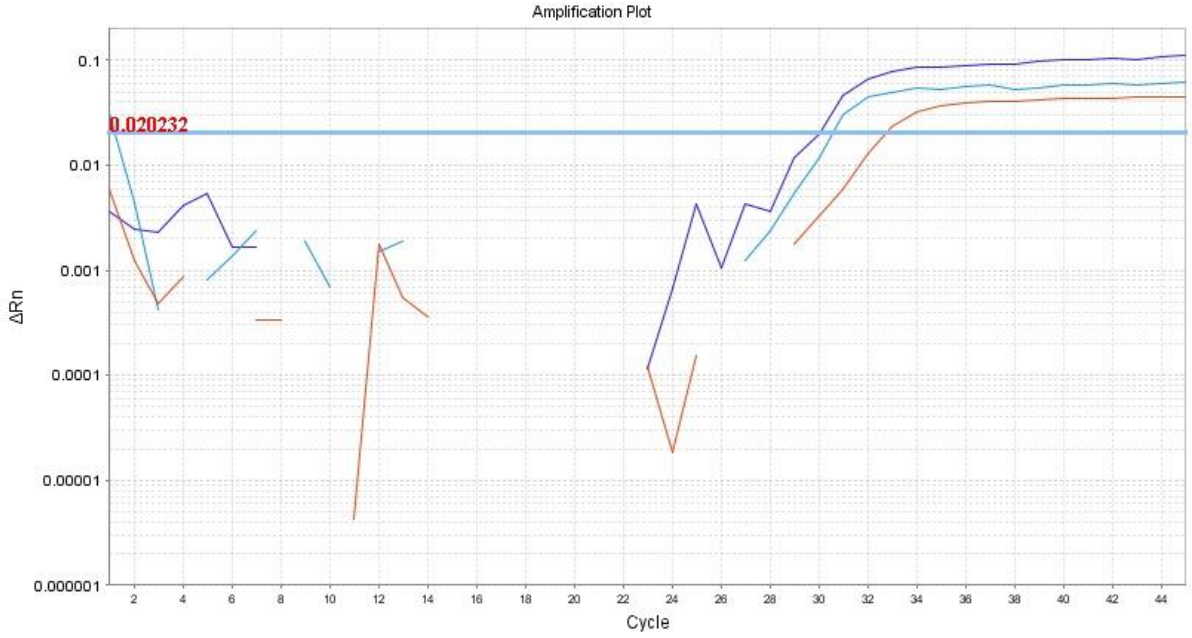
Tabela 05: Quantidade de espécimes por ponto, data, local, AIL e gêneros capturados

Ponto Local de Captura	05/05	06/05	07/05	Total Geral	Gêneros coletados
BOSQUE DAS AVES	**10**	**15**	**26**	**51**	
Copa (AIL 2)	3	9	18	30	*Aedes, Culex, Mansonia*
Solo (AIL 1)	7	6	8	21	*Aedes, Culex, Wyeomyia*
CORREDOR 61	**8**	**0**	**5**	**13**	
Copa (AIL 6)	7	0	3	10	*Culex*
Solo (AIL 5)	1	0	2	3	*Culex*
EXTRA	**9**	**20**	**0**	**29**	
Copa (AIL 16)	5	7	0	12	*Culex, Mansonia*
Solo (AIL 15)	4	13	0	17	*Anopheles, Culex, Wyeomyia*
LAGO 70	**25**	**5**	**0**	**30**	
Copa (AIL 12)	18	4	0	22	*Culex*
Solo (AIL 11)	7	1	0	8	*Aedes, Culex*
PONTE DO LAGO	**1**	**13**	**6**	**20**	
Copa (AIL 8)	1	8	6	15	*Culex*
Solo (AIL 7)	0	5	0	5	*Culex*
RECINTO 113	**2**	**26**	**23**	**51**	
Copa (AIL 4)	1	20	17	38	*Culex, Anopheles*
Solo (AIL 3)	1	6	6	13	*Culex, Anopheles*
RECINTO 69	**3**	**5**	**2**	**10**	
Copa (AIL 10)	0	5	0	5	*Culex*
Solo (AIL 9)	3	0	2	5	*Anopheles, Coquillettidia, Culex*
RECINTO FLAMINGOS	**16**	**30**	**0**	**46**	
Copa (AIL 14)	13	29	0	42	*Culex*
Solo (AIL 13)	3	1	0	4	*Aedes, Culex*
Total Geral	**74**	**114**	**62**	**250**	

4.2. RT-qPCR PARA FLAVIVÍRUS

Na RT-qPCR para pesquisa de *flavivirus* um exemplar de *Culex (Cux.)* sp gerou um gráfico de amplificação, com Ct (ciclo threshold) de 33 (Figura 03).

Figura 03 - Gráfico de Amplificação Rn x Ciclo em visualização logarítmica da amostra B191. Curvas de amplificação nas cores azul e azul claro destina-se aos controles positivo, a curva na cor vermelha destina-se a amostra.



4.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

A amostra que gerou gráfico de amplificação na RT-qPCR não foi identificada morfologicamente, por isso foi realizada uma identificação molecular onde este mosquito compartilha 99% de identidade com uma sequência de *Culex nigripalpus* (NC_037823.1) depositada no GenBank (Figura 04).

Figura 04: Alinhamento entre a sequência de *Culex nigripalpus* (Sbjct) e a sequência de *Culex* sp. (Query). Os pontos representam identidade e as bases em vermelho as diferenças.

Culex nigripalpus clone SP40_48 mitochondrion, complete genome

Sequence ID: NC_037823.1 Length: 15571 Number of Matches: 1

See 1 more title(s) See all Identical Proteins(IPG)

Range 1: 1456 to 2121 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1214 bits(657)	0.0	663/666(99%)	0/666(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     AAATCATAAAGATATTGGAACATTATATTTTATTTTTGGAGCTTGAGCTGGGATAATTGG  60
Sbjct  1456  ..................................................A........  1515

Query  61    TACTTCATTAAGTATTCTTATTCGAGCAGAATTAAGTCAACCTGGAGTATTTATTGGAAA  120
Sbjct  1516  ............................................................  1575

Query  121   TGATCAAATTTATAATGTTATTGTAACTGCTCATGCTTTTATTATAAtttttttATAGT  180
Sbjct  1576  ............................................................  1635

Query  181   TATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCC  240
Sbjct  1636  ............................................................  1695

Query  241   TGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGAATACTACCTCCTTCATTAAC  300
Sbjct  1696  ............................................................  1755

Query  301   ATTACTACTTTCAAGTAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGGACTGGATGAACAGTTTATCC  360
Sbjct  1756  ............................................................  1815

Query  361   CCCTCTTTCATCTGGTACAGCCCATGCTGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTTCTTT  420
Sbjct  1816  ............................................................  1875

Query  421   ACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTTAGGTGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAA  480
Sbjct  1876  ............................................................  1935

Query  481   TATACGATCTTCAGGAATTACGCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTTGTTAT  540
Sbjct  1936  ......................A.....................................  1995

Query  541   TACTGCTGTTCTTTTACTTCTTTCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATATTATT  600
Sbjct  1996  ............................................................  2055

Query  601   AACTGATCGAAATTTAAACACTTCATTTTTTGACCCAATTGGAGGAGGAGATCCAATTTT  660
Sbjct  2056  ..................T.........................................  2115

Query  661   ATATCA  666
Sbjct  2116  ......  2121
```

5. DISCUSSÃO

Trabalhos envolvendo pesquisa de arbovírus em Parques Zoológicos são escassos apesar da sua importância como possíveis fontes de entrada e disseminação de vírus, graças a natureza da atividade desenvolvida e fluxo de pessoas na região. No período de coleta das amostras usadas neste estudo, o Governo do Estado de São Paulo instituiu o fechamento do Zoológico como uma das medidas tomadas para o controle da Covid-19. Durante este período o fluxo de pessoas no parque era de apenas funcionários, além das armadilhas serem instaladas em áreas distantes dos visitantes e a coleta ter ocorrido em período noturno, o que pode ter favorecido a fonte de repasto para não humana e a possível detecção de flavivírus de fonte silvestre.

Utilizando-se 2 armadilhas em 8 pontos diferentes dentro do Parque, em três dias foram coletados 250 culicídeos com grande diversidade de gênero devido aos locais de instalações das armadilhas. O maior número de indivíduos coletados veio da copa, enquanto que no solo tivemos 4% dos indivíduos.

A maior parte dos mosquitos coletados na área pertencem ao gênero *Culex*, mosquitos de hábito noturno conhecidos pelo incômodo que causam à população humana, além de serem responsáveis por filarioses em algumas regiões (Sabatinelli *et al*., 1994 e Manimegalai Sukanya, 2014). A importância médica deste gênero também se dá pelo envolvimento na transmissão de arboviroses. Entre as espécies de *Culex* envolvidas na transmissão de arboviroses estão *Culex quinquefascitus, Cx. nigripalpus, Cx. declarator* e *Cx. coronator* (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994 e Forattini, 2002,), em nossas coletas identificamos morfologicamente fêmeas de *Cx. declarator* e *Cx. coronator.*

Outras espécies importantes foram encontradas na área como os *Aedes scapularis* e *Aedes fluviatilis*. A baixa frequência destas espécies era esperada já que elas possuem hábito diurno e as coletas foram realizadas no período noturno. *Aedes scapularis* recentemente foi encontrado naturalmente infectado pelo vírus da febre amarela em área verde urbana no município de São Paulo (Cunha *et al*. 2020), além de ter sido associado ao vírus Rocio (ROCV) (pertencente à família *Flaviviridae* e gênero Flavivírus) na região do Vale do Ribeira, *Aedes fluviatilis* já teve sua

competência vetorial para o vírus da febre amarela (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini 2002).

O número expressivo de fêmeas categorizadas como *Culex* sp *e Culex (Cux)* sp em nossas amostras se deve às estruturas danificadas dos insetos, provavelmente afetadas durante coleta utilizando-se as armadilhas CDCs. Com o sequenciamento do gene mitocondrial citocromo C oxidase I (COI), identificamos a espécie do mosquito positivo como *Culex nigripalpus*.

Culex nigripalpus é um mosquito subtropical distribuído pelo sul dos Estados Unidos, pela América Central e do Sul (Richards *et al*., 2011) considerado um importante vetor WNV e SLEV no sul dos EUA (Lord e Day, 2000; Blackmore, *et al*., 2003; Kilpatrick, *et al*., 2006; Simpson *et al*., 2012).

Neste trabalho observou-se uma amostra positiva para Flavivírus na RT-qPCR. Essa baixa taxa de infecção nas amostras/pools analisados (1/184) concorda com um estudo anterior realizado em dois Zoológicos na Alemanha em 2019. Neste estudo Heym, *et al*. pesquisaram três famílias de arbovírus (*Orthobunyavirus*, *Flavivirus* e *Alphavirus*) em 3840 mosquitos onde, 1 pool de 12 exemplares de *Culex pipens* foi positivo para Sindbis virus (*Alphavirus*), demonstrando a baixa taxa de mosquitos infectados.

Em um estudo realizado por Barrio-Nuevo, *et al*. (2020) foram amostrados 878 mosquitos, agrupados em 260 pools de até 10 indivíduos. Este estudo identificou flavivírus em 5 pools. Após sequenciamento, foram identificados os vírus DENV-2 e ZIKV em *Culex spp, Culex vaxus, Limatus durhamii, Anopheles cruzii e Weyomia confusa*. Embora essas espécies tenham sido coletadas na APE Capivari-Monos, o estudo demonstrou que mesmo DENV-2 e ZIKV sendo arbovírus urbanos e periurbanos podem ser detectados em área silvestre conservada. Este foi o primeiro estudo a detectar estes arbovírus em mosquitos de unidade de conservação de São Paulo.

O presente estudo contribui para o conhecimento da ocorrência de Flavivírus na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, trazendo informações sobre o vetor, contribuindo assim para a vigilância de zoonoses e podendo auxiliar nas medidas de controle.

6. CONCLUSÕES

Há evidência de ocorrência de *Flavivirus* na Fundação Parque Zoológico de São Paulo devido ao seu isolamento em amostra contendo 1 exemplar de *Culex nigripalpus*.

Ainda que tenhamos coletado 250 culicídeos, houve a identificação de espécies em 7 gêneros distintos indicando uma diversidade elevada.

O sequenciamento do gene citocromo C oxidase I auxiliou na identificação de amostra danificada, porém de interesse por estar infectada.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & AMP; LIPMAN, D.J. “Basic local alignment search tool.” **Journal Molecular Biology**, 1990. 215:403-410.

BLACKMORE, C. G. M.; STARK, L. M.; JETER, W. C.; OLIVERI, R.L.; BROOKS, R. G.; *et al*. Surveillance results from the first West Nile virus transmission season in Florida, 2001. **Am J Trop Med Hyg** 69: 141–150. 2003

BARRIO-NUEVO, K. M.; CUNHA, M. S.; LUCHS, A.; FERNANDES, A.; ROCCO, I. M.; MUCCI, L. F.; SOUZA, R. P.; MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JUNIOR, W.; MARRELLI, M. T. Detecção de vírus Zika e dengue em mosquitos coletados durante a vigilância de campo em uma área de proteção ambiental em São Paulo Brasil. **PLOS ONE**. São Paulo, 2020.

BRESSAN, P. M.; VALENTE, F. A. V.; GONÇALVES, M. L. **Relatório Anual 2019**. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, 2019.

CONSOLI. R. A. G. B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CUNHA, M. S. Validação e uso de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (RT-qPCR) para a vigilância e diagnóstico de flavivírus transmitidos por mosquitos circulantes no Brasil. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2018.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Agravos de A-Z. São Paulo, 2020. Disponível em < http://www.saude.sp.gov.br/cve centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/agravos-de-a z/indice-de-a-z>. acesso em 31 ago. 2020.

DIDO. M. R., MENEZES, R. M. T., GHIRARDELLI, C. P., MENDONÇA, A. L., NETO, F. C. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. São Paulo: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2011.

FIORAVANTI. C. H. O combate à febre amarela no estado de São Paulo: histórias, desafios e inovações. São Paulo; SES/SP.183 p. 2018

GARCIA, L. P. Epidemia do vírus zika e microcefalia no brasil: emergência, evolução e enfrentamento. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica aplicada, 2018.

GUIMARÃES, L. DE O.; SIMÕES, R. F.; CHAGAS, C. R. F.; MENEZES, R. M. T. DE; SILVA,F. S; MONTEIRO, E. F.; HOLCMAN, M. M.; BAJAY, M. M.; PINTER, A.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE AND KIRCHGATTER, K. . Assessing diversity, Plasmodium infection and blood meal hosts in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian zoological park with avian malaria transmission. **Insects**. 2021. Submetido.

HARBACH, R. Harbach RE Mosquito Taxonomy inventory. Fonte: Mosquito Taxonomic Inventory: http://mosquito-taxonomic-inventory.info/ acesso em: 15 de fevereiro de 2021.

HEYM,E. C., KAMPEN, H., KRONE, O., SCHÄFER, M., WERNE, D. Molecular detection of vector-borne pathogens from mosquitoes collected in two zoological gardens in Germany. **Parasitol Res**. 2019 Jul;118(7):2097-2105. doi: 10.1007/s00436-019-06327-5.

HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; HORNE, K. M.; VANLANDINGHAM, D. L. Flavivírus-Mosquito Interactions. Manhattan: **Journal Viruses**, 2014.

JUNIOR, A. V.; AMARAL, A. P. C.; ELMEC, A. M.; SALA, A.; SANTOS, F. C. P.; FERREIRA, I. T. R. N.; CAMIS, M. C. R. S.; TIMENETSKY, M. C. S. T.; SARDINHA, M. E. M. F.; CRUZ, M. G. B.; TANAKA, P. K.; SECCO, R. H.; ALVES, S. A.; ALVAREZ, S. M. L.; SAMPAIO, S. M. P.; REHDER, S.; TEIXEIRA, R. F.; COUTO, R. A.; BARROS, T. G. T. Diretrizes para a prevenção e controle das arboviroses urbanas no estado de São Paulo. São Paulo: Diretrizes, 2017.

KILPATRICK, A. M.; KRAMER, L. D.; JONES, M. J.; MARRA, P. P.; DASZAK. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. **PLoS Biol**. 4:e82. 2006.

LANE, J. Neotropical Culicidae. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2v, 1953.

LIMA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. São Paulo: **Revista Saúde Pública**, 2016.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Ananindeua: **Revista Pan - Amazônica Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014.

LORD, C. C.; DAY, J. F. Attractiveness of chickens and bobwhite quail for *Culex nigripalpus*. **Mosq. Control Assoc**. 16, 271–273. 2000

MACKENZIE J. S.; WILLIAMS D. T. The Zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. **Zoonoses Public Health**. 2009.

MANIMEGALAI K, SUKANYA S. Biology of the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). 2014 Int **J Curr Microbiol** App Sci 3 (4): 718–24

OLIVEIRA, A. C.; BARBOSA, A. E. A.; SOUSA, A. E. B. A.; LUGARINI, C.; LIMA, D. M.; NASCIMENTO, J. L. X.; SOUZA, M. A.; SERAFINI, P. P.; AMARAL, P. P.; MEDEIROS, R. C. S. Relatório anual de rotas e áreas de concentração de aves migratórias no Brasil. Paraíba: ICMBio, 2016.

PATEL, P.; LANDT, O.; KAISER, M.; FAYE, O.; KOPPE, T.; LASS, U.; SALL, A.A. NIEDRIG M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. Virol J. Feb 14; 10:58, 2013.

SAAD, L. D. C.; BARATA, R. B. Surtos de febre amarela no estado de São Paulo, 2000-2010. São Paulo: Epidemiologia e Serviços de Saúde. v. 25, n. 3, p. 531-40, 2016.

SABATINELLI, G.; RANIERI, E.; GIANZI; PAPAKAY; CANCRINI F. P. M. G. Role of *Culex quinquefasciatus* in the transmission of bancroftian filariasis in the Federal Islamic Republic of Comoros (Indian Ocean). Parasite [Article in French] 1994 Mar;1(1):71-6. doi: 10.1051/parasite/1994011071.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS. M. T. V. WIGG; M. D. Virologia Humana. Rio de Janeiro: Gen, 3.ed, 2015.

SIMPSON, J. E.; HURTADO, P.J; MEDLOCK, J.; MOLAEI, G.; ANDREADIS, T.G.; *et al*. Vector host-feeding preferences drive transmission of multi-host pathogens: West Nile virus as a model system. Proc Biol Sc i 2012 Mar 7;279(1730):925-33. doi: 10.1098/rspb.2011.1282. Epub 2011 Aug 17.

SIMPSON, J. E.; HURTADO, P.J; MEDLOCK, J.; MOLAEI, G.; ANDREADIS, T.G.; *et al*. Vector host-feeding preferences drive transmission of multi-host pathogens: West Nile virus as a model system. Proc. R. Soc. Lond. B 279:925–33. 2012.

WILLEM T., N. O Verhulst. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. **Review Annu Rev Entomol.** 2013;58:433-53.